



LUC7L3/CROP inhibits replication of hepatitis B virus via suppressing enhancer II/basal core promoter activity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 媛 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3152

博士(医学) 李 媛

論文題目

LUC7L3/CROP inhibits replication of hepatitis B virus via suppressing enhancer II/basal core promoter activity

(LUC7L3/CROP はエンハンサーII/ベーサルコアプロモーターを抑制することにより B 型肝炎ウイルスの複製を阻害する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

B 型肝炎ウイルス(HBV)は肝疾患の主要な原因因子であり、持続感染者数は、現在、世界的に約 3 億 5000 万人とされている。HBV ゲノムは 3.2 kb の不完全な二本鎖 DNA であるが、ゲノム複製において RNA(プレゲノム RNA)がその中間体となる点がユニークである。HBV ゲノム上にはプロモーター領域が 4 か所存在するが、そのうちコアプロモーターからはプレゲノム RNA が合成される。プレゲノム RNA は複製中間体となるだけでなく、コアタンパク質、ポリメラーゼをコードすることから HBV の生活環において極めて重要な役割を担っている。コアプロモーターの活性化・抑制化は HBV のゲノム複製やウイルス産生を左右するがその制御機構の全容は必ずしも十分解明されていない。本研究では、HBV のコアプロモーター活性に重要なエンハンサーII/ベーサルコアプロモーター(ENII/BCP)領域に結合し活性制御に働く新規宿主因子を同定し HBV 複製における役割を明らかにした。

[材料と方法]

HBV ENII/BCP 結合因子は、FactorFinder Kit により回収し質量分析によって同定した。HBV ゲノム DNA1.3 倍長を保持するプラスミドをヒト肝がん細胞株 HuH-7 へトランスフェクションし、HBV ゲノムの複製、ウイルス産生を解析した。発現するウイルスタンパク質をウエスタンブロット法で、プレゲノム RNA を定量 RT-PCR で、ウイルス DNA 複製をサザンブロット法でそれぞれ解析した。産生されるウイルスレベルの指標として培養上清の粒子内 HBV DNA を定量 PCR で測定した。LUC7L3/CROP 等宿主因子の強制発現には CAG プロモーター含プラスミドを利用し、遺伝子ノックダウンには特異的 siRNA を用いた。HBV コアプロモーター全長または種々の部分欠損体をルシフェラーゼレポーター pGL4.10 へ組み込み、HuH-7 細胞へトランスフェクションしプロモーター活性を解析した。LUC7L3/CROP の細胞内局在は免疫蛍光抗体法で解析した。

[結果]

HuH-7 細胞の核分画とビオチン化 HBV ENII/BCP DNA(191 塩基長)を混和し DNA 結合タンパク質を回収した。同定した 89 種類のタンパク質の中から、遺伝子ノックダウンによって HBV コアプロモーター活性が有意に上昇する因子として LUC7L3/CROP を見出した。LUC7L3/CROP mRNA は大部分のヒト臓器で発現してお

り、小腸で最も高発現し肝臓では比較的高い発現を示した。

HBV 遺伝子発現、複製等への LUC7L3/CROP の影響を更に解析した。その結果、遺伝子ノックダウンにより HBV ENII/BCP 活性、HBV コアタンパク質と HBs タンパク質の発現、HBV 粒子産生は有意に亢進することが示され、逆に LUC7L3/CROP の強制発現では、ENII/BCP 及びコアプロモーター活性、HBV タンパク質発現、ウイルス産生は低下した。LUC7L3/CROP は、2 か所のジンクフィンガーモチーフ、2 か所のロイシンジッパー様リピートまたアルギニン/セリンリッチドメインを有するが、HBV コアプロモーター活性の抑制またゲノム複製抑制効果には N 末端側のジンクフィンガーモチーフが重要であることが示された。

一方、ENII/BCP 領域内の LUC7L3/CROP 標的配列を明らかにするため、ENII/BCP 部分欠損体を用いて解析したところ、HBV ゲノム上の nt 1666-1700 領域が LUC7L3/CROP による ENII/BCP 活性阻害に重要であることが示された。核分画を用いた DNA プルダウンアッセイでは、nt 1666-1700 の欠損により LUC7L3-ENII/BCP 相互作用は解除されたが、ゲルシフトアッセイでは LUC7L3/CROP と ENII/BCP DNA との直接結合は認められなかった。

LUC7L3/CROP はスプライシング関連因子であること(「考察」参照)から、HBV プレゲノム RNA のスプライシングへの影響を調べたところ、HBV スプライシングの促進に働くことが示された。

[考察]

LUC7L3/CROP は、yeast U1 snRNP 構成因子 Luc7p のヒト相同体として同定され、アポトーシス関連因子 Bcl-x やナトリウムチャンネル因子 SCN5A などの mRNA スプライシングの調節に関与することが報告されている。また、シスプラチン耐性機構に関連する分子として Differential Display 法によって単離されているが薬剤耐性における作用機序は全く不明である。本研究では、LUC7L3/CROP が HBV のスプライシング促進に働いただけでなく、HBV 遺伝子発現において最も重要な転写調節を担うコアプロモーターを負に制御することを見出した。LUC7L3/CROP は ENII/BCP nt 1666-1700 領域への直接結合を示さなかったことから、同領域に結合しコアプロモーター活性亢進に働く転写因子と会合する可能性を考えた。候補転写因子として HNF4 α と C/EBP β を考え解析を行ったが LUC7L3/CROP との関連は認められなかった。LUC7L3/CROP の作用機序解明のためには更なる解析が必要である。

HBV の生活環における LUC7L3/CROP の意義については推測の域を出ないが、感染初期など高増殖状態の際、ゲノム複製にブレーキをかけることにより、免疫系からのエスケープ、持続感染化に寄与する可能性が考えられる。

[結論]

HBV コアプロモーター内 ENII/BCP 領域を標的とし、コアプロモーター、ENII/BCP 活性さらに HBV ゲノム複製を負に制御する新規宿主因子として LUC7L3/CROP を同定した。LUC7L3/CROP はこれまでスプライシング調節機能が知られていたが、本研

究によって、転写調節またウイルス増殖制御への関与が初めて示された。